

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07K 14/47</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/12912</b> (43) Date de publication internationale: 10 avril 1997 (10.04.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01553</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 octobre 1996 (04.10.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/11714 5 octobre 1995 (05.10.95) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHASSAING, Gérard [FR/FR]; 11, place Souham, F-75013 Paris (FR). PROCHANTZ, Alain [FR/FR]; 8, rue Marie-Pape-Carpentier, F-75006 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataires: PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>

(54) Title: PEPTIDES USABLE AS VECTORS FOR THE INTRACELLULAR ADDRESSING OF ACTIVE MOLECULES

(54) Titre: PEPTIDES UTILISABLES COMME VECTEURS POUR L'ADRESSAGE INTRACELLULAIRE DE MOLECULES ACTIVES

NH<sub>2</sub>

X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (I)

X<sub>16</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub> (Ia)

COOH

(57) Abstract

The invention relates to a peptide having the sequence (I) or (Ia), wherein X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> each represent an α-aminoacid, X<sub>6</sub> representing tryptophane. Said peptide comprises between 6 and 10 hydrophobic aminoacids. The invention also relates to the use of said peptide for introducing into living cells an active molecule acting on cellular functions.

(57) Abrégé

L'invention est relative à un peptide de séquence (I) ou (Ia) où X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, X<sub>6</sub> représentant le tryptophane. Ce peptide comprend entre 6 et 10 acides aminés hydrophobes. L'invention est également relative à l'utilisation dudit peptide pour introduire dans des cellules vivantes une molécule active sur les fonctions cellulaires.

BEST AVAILABLE COPY

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## PEPTIDES UTILISABLES COMME VECTEURS POUR L'ADRESSAGE INTRACELLULAIRE DE MOLECULES ACTIVES.

La présente Invention est relative à une classe de peptides capables de traverser les membranes cellulaires et de parvenir aux divers compartiments de la cellule.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes de différentes substances dotées de propriétés pharmacologiques, et de leur accès aux divers compartiments intracellulaires, en particulier le compartiment cytoplasmique et le compartiment nucléaire, revêt une grande importance, tant pour la recherche que pour l'utilisation thérapeutique.

On connaît actuellement un nombre limité de moyens d'introduire des substances telles que les polypeptides et les oligonucléotides dans les compartiments intracellulaires. Parmi les différentes techniques actuellement proposées on peut citer :

1. La transfection de gènes, et les techniques dérivées permettant d'améliorer *in vivo* ou *in vitro* les taux de transfection, telles que la précipitation au phosphate de calcium, l'utilisation de lipides cationiques, l'électroporation, la trituration (scrape loading), l'utilisation de vecteurs viraux, etc...

2. La liaison à des récepteurs de la membrane cellulaire ; ces récepteurs sont par la suite endocytosés, et libèrent dans le compartiment cytoplasmique les molécules liées. Dans cette catégorie on peut citer le récepteur du folate, la toxine diphtérique, ou des facteurs de transcription comme la protéine TAT du rétrovirus HIV. Le mécanisme de transport impliquant ces récepteurs est encore mal connu, mais nécessite dans tous les cas une étape d'endocytose.

3. Les peptides de type homéodomaine. Des travaux antérieurs effectués par l'équipe des Inventeurs sur l'homéodomaine du facteur de transcription

Antennapedia (AntpHD) ont permis de montrer que les peptides homéodomaine traversent les membranes plasmiques par un processus énergie-indépendant, et donc distinct de l'endocytose. La 3ème hélice du peptide homéodomaine possède les mêmes propriétés [JOLIOT et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, P. 1864-1868 (1991) ; DEROSI et al., J. Biol. Chem. 269, 14, p. 10444-10450, (1994)].

Ces propriétés ont été utilisées pour internaliser dans des cellules des polypeptides et des oligonucléotides liés à l'homéodomaine ou à l'hélice 3, [PEREZ et al., J. Cell. Science, 102, p. 712-722, (1992)] par fusion génétique ou liaison biochimique. Cette entrée est quantitative, et le vecteur et son chargement sont retrouvés dans 100% des cellules ; en outre, l'internalisation est indépendante du type cellulaire concerné.

Le plus petit fragment de l'homéodomaine capable de traverser les membranes et de servir de vecteur à d'autres peptides ou bien à des oligonucléotides est un peptide de 16 acides aminés, correspondant à l'hélice 3. Ce peptide, qui comprend les acides aminés 43 à 58 de l'homéodomaine, est dénommé ci-après. A titre d'exemple, la séquence du peptide 43-58 de l'homéodomaine Antp est la suivante :

Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

Cette séquence est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1.

Le mécanisme par lequel ce peptide pouvait pénétrer dans les cellules vivantes a fait l'objet de diverses études, et il était supposé jusqu'à présent que sa structure en alpha-hélice était indispensable pour l'internalisation. L'équipe des Inventeurs a montré précédemment que certaines substitutions ou délétions dans la séquence peptidique, qui modifiaient la structure du peptide, interféraient avec l'activité de celui-ci. Par exemple, un peptide dans lequel les 2 Trp (48 et 56) sont remplacés par deux Phe, ou un peptide comprenant les

acides aminés 41 à 55 de l'homéodomaine ne sont pas internalisés (DEROSSI et al., 1994, publication précitée). Une autre équipe [BRUGIDOU et al., Biophys. Biochem. Res. Com., 214:2, pp 685-693, (1995)] a observé  
 5 l'internalisation de peptides constituant des analogues structuraux du peptide 43-58 ; pour cela, ils ont construit, à partir d'un peptide 43-58 (différant du peptide 43-58 de l'homéodomaine Antp en ce que les 2 isoleucines aux positions 45 et 47 sont remplacées par  
 10 des valines), des variants de type *retro-inverso*. Les variants *retro-inverso*, qui permettent d'imiter la structure tridimensionnelle de peptides naturels, sont constitués par des acides aminés de la série D (au lieu des acides aminés de la série L des peptides naturels)  
 15 enchaînés selon une séquence inverse de celle du peptide à reproduire.

Les Inventeurs ont maintenant cherché à définir les caractéristiques minimales des séquences d'acides aminés capables de servir de vecteur  
 20 d'internalisation et d'adressage de polypeptides et d'oligonucléotides, et dans ce but ont synthétisé plusieurs peptides en modifiant spécifiquement certains résidus.

La présente Invention a pour objet un peptide  
 25 répondant à l'une des séquences (I) ou (Ia) suivantes :

NH<sub>2</sub>

X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (I)

X<sub>16</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub> (Ia)

COOH

30 où X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, lequel peptide est caractérisé en ce qu'il comprend entre 6 et 10 acides aminés hydrophobes, et en ce que X<sub>6</sub> représente le tryptophane, à l'exception des peptides suivants :

35 - le peptide dont la séquence est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N0:1 ;

- les peptides dans lesquels X3 et X5 représentent chacun un résidu valine.

Les acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la  
5 phénylalanine, le tryptophane, et la méthionine.

Le reste des acides aminés qui entrent dans la constitution des peptides conformes à l'invention sont des acides aminés non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés polaires (glycine, sérine, thréonine,  
10 cystéine, tyrosine, asparagine, glutamine), acides (acide aspartique ou glutamique) ou basiques (lysine, arginine ou histidine), ou une association d'acides aminés de ces trois catégories.

Selon un mode de réalisation préféré d'un peptide conforme à l'invention, il comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

L'enchaînement d'acides aminés non-hydrophobes polaires ou chargés, et d'acides aminés hydrophobes confère aux peptides conformes à l'invention un caractère  
20 amphiphile, qui d'après les expérimentations effectuées par les Inventeurs, apparaît essentiel pour leurs propriétés. Ces expérimentations ont en outre permis de mettre en lumière d'autres caractéristiques essentielles pour la translocation intracellulaire, et de montrer  
25 que :

- la translocation intracellulaire ne nécessite pas de récepteur spécifique, et peut donc concerner tous les types cellulaires ;
- la structure en alpha-hélice n'intervient pas dans  
30 la translocation intracellulaire, (mais joue sans doute un rôle dans l'adressage nucléaire) ;
- les propriétés amphiphiles du peptide, ainsi que la présence d'un résidu Trp apparaissent en revanche importantes pour la translocation.

35 De préférence, un peptide conforme à l'Invention est constitué de séquences comprenant de 1 à 6

acides aminés non-hydrophobes et de 1 à 6 acides aminés hydrophobes, réparties en alternance le long de la chaîne peptidique.

Selon un autre mode de réalisation d'un peptide conforme à l'invention,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_9$ ,  $X_{15}$ ,  $X_{16}$ , sont des acides aminés non-hydrophobes et  $X_3$ ,  $X_7$ , et  $X_{14}$ , sont des acides aminés hydrophobes. Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation,  $X_{14}$  représente le tryptophane ou l'isoleucine.

Les propriétés de pénétration intracellulaire des peptides conformes à l'invention sont comparables à celles de l'hélice 3 d'un peptide homéodomaine, et permettent leur utilisation comme vecteur d'internalisation et d'adressage intra-cellulaire, pour introduire dans des cellules vivantes des molécules actives sur les fonctions cellulaires, en particulier d'autres peptides, ou des séquences nucléotidiques.

Pour obtenir un adressage plus spécifiquement cytoplasmique de la molécule active que l'on souhaite introduire, on utilisera de préférence un peptide conforme à l'invention dans lequel au moins l'un des acides aminés en position  $X_3$ ,  $X_7$ , et  $X_{14}$  est une proline.

Pour la mise en oeuvre de la présente Invention, le polypeptide ou l'oligonucléotide à transporter est lié à un peptide conforme à l'invention.

Les produits de fusion d'un peptide conforme à l'invention avec une autre séquence peptidique, ou avec une séquence oligonucléotidique peuvent être obtenus par différents moyens connus en eux-mêmes. Dans le cas d'un polypeptide on pourra utiliser par exemple par les techniques classiques du génie génétique, ou de la synthèse peptidique. Dans le cas d'un oligonucléotide on utilisera par exemple la technique décrite par LEMAITRE et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 648-652, (1987)], ou celle de MATSUEDA et al. [Chemistry Letters,

p. 951-952, (1978) and Int. J. of Peptide and Protein Research, p. 107-112 (1986)].

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple montrant les propriétés de différents peptides conformes à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que cet exemple est donné uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont il ne constitue en aucune manière une limitation.

#### EXEMPLE

10 peptides, dont les séquences sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:10 ont été synthétisés. Tous ces peptides ont en outre été pourvus à leur extrémité N-terminale d'un bras aminopentanoïque et d'une biotine permettant de suivre leur internalisation ; les peptides ainsi modifiés sont représentés sur les Tableaux I et II ci-après.

20



Tableau I43-58

Biot-Apa-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

41-55

Biot-Apa-Thr-Glu-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys

58-43

Biot-Apa-Lys-Lys-Trp-Lys-Met-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Trp-Ile-Lys-Ile-Gln-Arg

43-58 D

Biot-Apa-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

Pro50Biot-Apa-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys3ProBiot-Apa-Arg-Gln-Pro-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Lys-Pro-Trp-Lys-Lys

Tableau IIMet-Arg

Biot-Apa-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Met-Arg-Arg-Lys-Trp-Lys-Lys

7 Arg

Biot-Apa-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Arg-Trp-Arg-Arg

W/R

Biot-Apa-Arg-Arg-Trp-Arg-Arg-Trp-Trp-Arg-Arg-Trp-Arg-Arg-Trp-Arg-Arg

LR/

Biot-Apa-Arg-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Arg-Leu-Arg-Arg

Légende du Tableau I

43-58 : Peptide hélice 3°

41-55 : Témoin : Peptide non-intériorisé (voir DEROSI et al., 1994)

5 58-43 : Séquence inverse

43-58 D : Peptide 3° hélice (43-58) constitué d'acides aminés de la série D

Pro50 : Peptide 43-58 avec une Proline en 50 (au lieu de Gln)

10 3Pro : Peptide 43-58 avec 3 Prolines en positions 45, 50 et 55, à la place respectivement des résidus Ile, Gln et Lys.

Légende du Tableau II

15 Met-Arg : Peptide 43-58 avec Met en 52 (au lieu de Arg) et Arg en 54 (au lieu de Met)

7Arg : Toutes les Lysines du peptide 43-58, sauf celle en 46 sont remplacées par des Arg

W/R : Peptide 43-58 très modifié, consiste essentiellement en une succession de Trp et Arg

20 L/R : Peptide W/R avec des Leu en place des Trp.

L'entrée de ces différents peptides dans des cellules en culture a été étudiée, dans les mêmes conditions et en utilisant les mêmes protocoles que ceux  
25 décrits par DEROSI et al. (1994, publication précitée).

L'entrée des peptides dans les cellules nerveuses ou des fibroblastes en culture a été examinée à 4 et 37°C.

L'entrée des peptides du Tableau I a été  
30 testée par microscopie confocale, gel d'électrophorèse et ELISA.

L'entrée des peptides du Tableau II a été testée uniquement par microscopie confocale ; en effet, l'absence de lysine dans ces peptides rend les fixations  
35 très difficiles et demande donc une observation rapide

incompatible avec des transferts sur filtres ou des tests ELISA (multiples lavages).

**1) Internalisation à 37°C et à 4°C des peptides 43-58, 58-43, D43-58, Pro50 et 3Pro**

5 Des cellules de cortex embryonnaire E15 ont été incubées ( $1,1 \cdot 10^6$  cellules/ml) pendant 2h à 37°C ou à 4°C, avec les peptides 43-58, 58-43, D43-58, Pro50 et 3Pro, à la concentration de 44 µM pour une quantité 1X, ou sans peptide (puits C).

10 La présence des peptides dans le milieu d'incubation et dans les cellules après lavage de celles-ci à la trypsine a été analysée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12-22% et par électrotransfert.

Les résultats sont illustrés sur les figures  
15 1A, 1B (37°C) et 2 (4°C).

Légende de la figure 1 :

A : autoradiogramme des extraits cellulaires après révélation par bioluminescence (LUMINOL®, AMERSHAM).

20 B : autoradiogramme des milieux d'incubation après révélation par bioluminescence.

Légende de la figure 2 :

Le puits SP correspond au dépôt sur le gel de 1 µl de substance P.

25 Tous les peptides du tableau 1, à l'exception de 41-55 sont internalisés à 4 et 37°C et récupérés dans les cellules. Le peptide 43-58 est dégradé (50% environ) à 37°C mais pas à 4°C.

**2) Localisation cellulaire des peptides 43-58, 51-55, 58-43, D43-58, Pro50 et 3Pro à 37°C et 4°C.**

30 Les cellules de cortex et striatum E15 sont mises en culture sur des lamelles de verre à une densité de 25000 cellules/cm<sup>2</sup> pendant 2 jours. Les peptides sont tous ajoutés à une concentration de 20 µM finale. Après  
35 2h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées, fixées et la présence de biotine est révélée par streptavidine

fluorescente. Les sections observées en microscopie confocale sont présentées sur les figures 3 (37°C) et 4 (4°C). Les cellules ayant intégré le peptide apparaissent fluorescentes, sur fond noir.

5                   Légende de la figure 3 :

1 : peptide 43-58,	2 : peptide 58-43,
3 : peptide D43-58,	4 : peptide Pro50
5 : peptide 3Pro,	6 : peptide 41-55.

Légende de la figure 4 :

10           1 : peptide 43-58,	2 : peptide 58-43,
3 : peptide D43-58,	4 : peptide Pro50
5 : peptide 3Pro,	6 : peptide 41-55.

La présence de prolines (Pro 50 ou 3Pro) n'empêche pas l'internalisation mais semble interférer avec l'adressage nucléaire. L'entrée des peptides testés est également observée dans les fibroblastes (non montré).

3) **Dosage colorimétrique des internalisations des peptides 43-58, 51-55, 58-43, D43-58, Pro50, et 3Pro à 37°C et 4°C.**

Des cellules de cortex et striatum E15 (B) ou E16 (A) ont été incubées ( $1,1.10^6$  cellules/ml) avec les peptides à la concentration de 17  $\mu$ M (A) ou 44  $\mu$ M (B) pour les quantités 1X, ou sans peptides (9). Les cellules ont été lavées au NaCl 0,5 M (A) ou à la trypsine (B). Elles sont mises en culture sur plaque ELISA, fixées et une révélation des peptides biotinylés est faite en utilisant un substrat coloré (PNPP) de la phosphatase alcaline couplée à la streptavidine.

30                   Les résultats sont illustrés par les figures 5A et 5B.

Légende des figures 5A et 5B :

A : expérience à 37°C ;  
B : expérience à 4°C

35           1 : peptide 43-58 1X
2 : peptide 43-58 4X

12

- 3 : peptide 58-43 1X  
4 : peptide D43-58  
5 : peptide Pro50  
6 : peptide 3Pro  
5 7 : peptide 41-55 1X  
8 : peptide 41-55 4X, échantillon non présent en A  
9 : pas de peptide.

4) Internalisation à 37°C des peptides Met-Arg, W/R et  
10 L/R

Des cellules de cortex et striatum E15 sont mises en culture sur lamelles de verre à une densité de 25000 cellules/cm<sup>2</sup> pendant 2 jours. Les peptides sont ajoutés à une concentration de 20 µM finale pour le  
15 peptide 43-58 et de 2 µM pour les autres et les cellules sont incubées 2h à 37°C. Les cellules sont lavées, fixées et la biotine des peptides est révélée par streptavidine-FITC. Les résultats sont illustrés par la Figure 6.

Légende de la figure 6 :

- 20 1 : peptide 7 Arg  
2 : peptide Met-Arg  
3 : peptide W/R  
4 : peptide L/R.

On observe une internalisation et un adressage  
25 cytoplasmique et nucléaire du Met-Arg, du 7Arg et du W/R. Toutefois, le peptide L/R est retrouvé dans une fraction apparemment de type vésiculaire, probablement de caractère endocytaire.

### CONCLUSION

Les résultats obtenus avec les peptides du Tableau I permettent de conclure que :

- 5 - l'internalisation ne nécessite pas de récepteur puisque les peptides 58-43 et 43-58D sont internalisés. Or le premier a une séquence différente de celle du peptide initial (même si sa structure générale d'hélice amphiphile est conservée), et le peptide constitué d'acides aminés de la série D ne doit pas interagir avec un  
10 récepteur naturel composé d'acides aminés de la série L ;
- la structure en hélice alpha n'est pas nécessaire puisque l'introduction d'une proline et - a  
15 *fiortiori* de 3 détruit l'hélicité. Cependant on note que l'addition des prolines peut interférer avec l'adressage nucléaire.

En ce qui concerne les peptides du Tableau II, on peut conclure des résultats obtenus que :

- 20 - l'amphiphilicité est nécessaire pour l'internalisation, mais elle n'est pas suffisante, dans la mesure où le L/R n'a pas les propriétés du W/R
  - la présence et la position des résidus Trp ont  
25 leur importance.
- Les inventeurs ayant également démontré l'internalisation de l'homéodomaine de l'homéoprotéine Engrailed, qui n'a pas le résidu Trp en 56 (qui est remplacé par un résidu Ile)  
30 mais a conservé celui en 48, on peut en conclure que seul le Trp 48 est important pour la translocation.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
- C.N.R.S.

(B) RUE: 3, RUE MICHEL ANGE

(C) VILLE: PARIS

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

(A) NOM: CHASSAING GERARD

(B) RUE: 11, PLACE SOUHAM

(C) VILLE: PARIS

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75013

(A) NOM: PROCHIANTZ ALAIN

(B) RUE: 8, RUE MARIE-PAPE CARPENTIER

(C) VILLE: PARIS

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75006

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PEPTIDES UTILISABLES COMME VECTEURS POUR  
L'ADRESSAGE INTRACELLULAIRE DE MOLECULES ACTIVES.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 10

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 95 11714

(B) DATE DE DEPOT: 05-OCT-1995

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS:

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:



15

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys
1				5					10					15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Lys	Lys	Trp	Lys	Met	Arg	Arg	Asn	Gln	Phe	Trp	Ile	Lys	Ile	Gln	Arg
1				5					10					15	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Peptide
- (B) EMLACEMENT: 1..16
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "Acides amines de la serie D"

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	

16

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1                      5                                      10                                      15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys  
1                      5                                      10                                      15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Met Arg Arg Lys Trp Lys Lys  
1                      5                                      10                                      15

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Arg	Trp	Arg	Arg
1				5					10					15	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Arg	Arg	Trp	Arg	Arg	Trp	Trp	Arg	Arg	Trp	Trp	Arg	Arg	Trp	Arg	Arg
1				5					10					15	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Arg	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg
1				5				10					15	

## REVENDICATIONS

1) Peptide répondant à l'une des séquences (I) ou (Ia) suivantes :

NH<sub>2</sub>

5 X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (I)

X<sub>16</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub> (Ia)

COOH

où X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, lequel peptide est caractérisé en ce qu'il comprend entre 6 et 10 acides aminés hydrophobes, et en ce que X<sub>6</sub> représente le tryptophane, à l'exception des peptides suivants :

- le peptide dont la séquence est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ;
- 15 - les peptides dans lesquels X<sub>3</sub> et X<sub>5</sub> représentent chacun un résidu valine.

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

20 3) Peptide selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est constitué de séquences comprenant de 1 à 6 acides aminés non-hydrophobes et de 1 à 6 acides aminés hydrophobes, réparties en alternance le long de la chaîne peptidique.

25 4) Peptide selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, sont des acides aminés non-hydrophobes et X<sub>3</sub>, X<sub>7</sub>, et X<sub>14</sub>, sont des acides aminés hydrophobes.

30 5) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce que X<sub>14</sub> représente le tryptophane ou l'isoleucine.

35 6) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 5, pour introduire dans des cellules vivantes une molécule active sur les fonctions cellulaires.

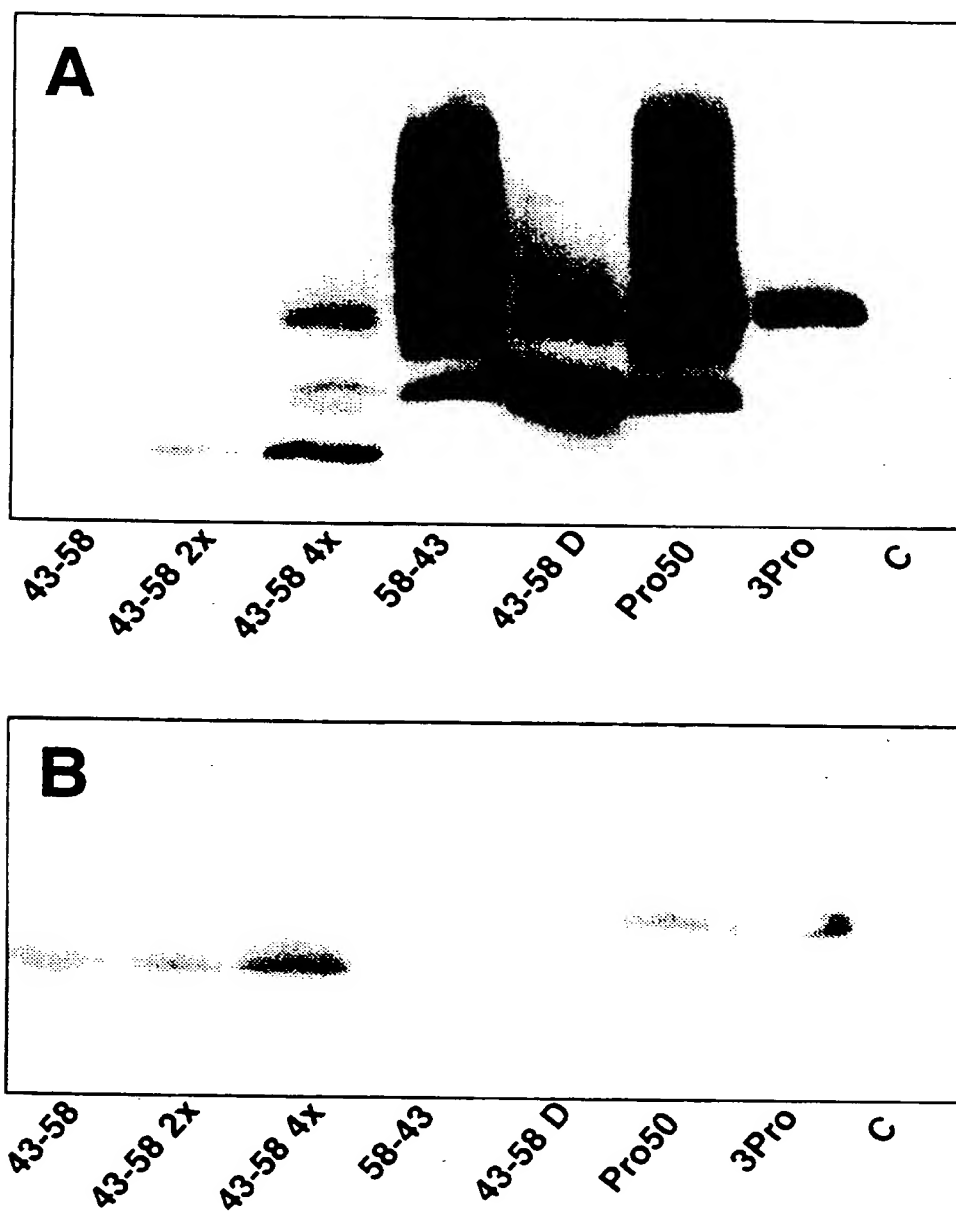
7) Utilisation selon la revendiction 6, caractérisée en ce que la molécule active sur les fonctions cellulaires est un peptide

5 8) Utilisation selon la revendiction 6, caractérisée en ce que la molécule active sur les fonctions cellulaires est une séquence nucléotidique.

9) Utilisation selon une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'on utilise un peptide de formule I dans lequel au moins l'un des acides  
10 aminés en position  $X_3$ ,  $X_7$ , et  $X_{14}$  est une proline.

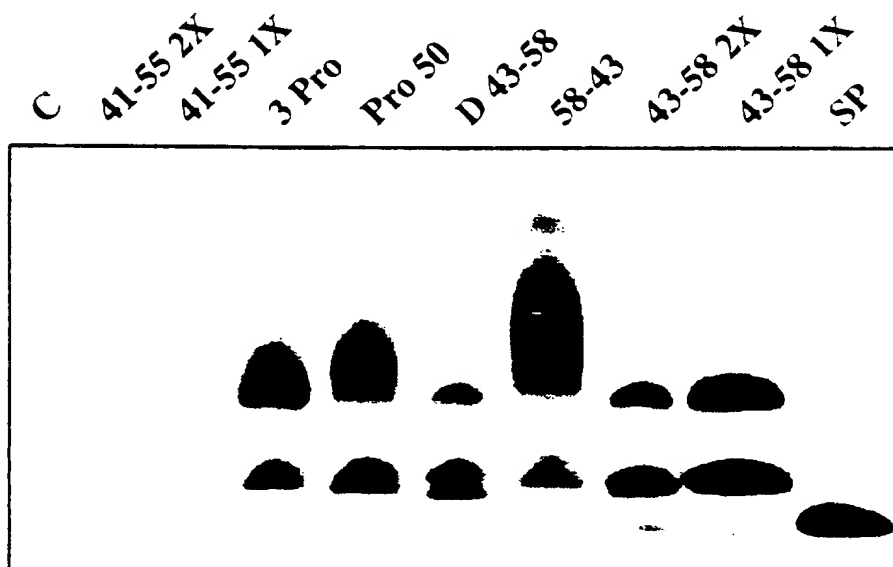
1/6

FIGURE 1



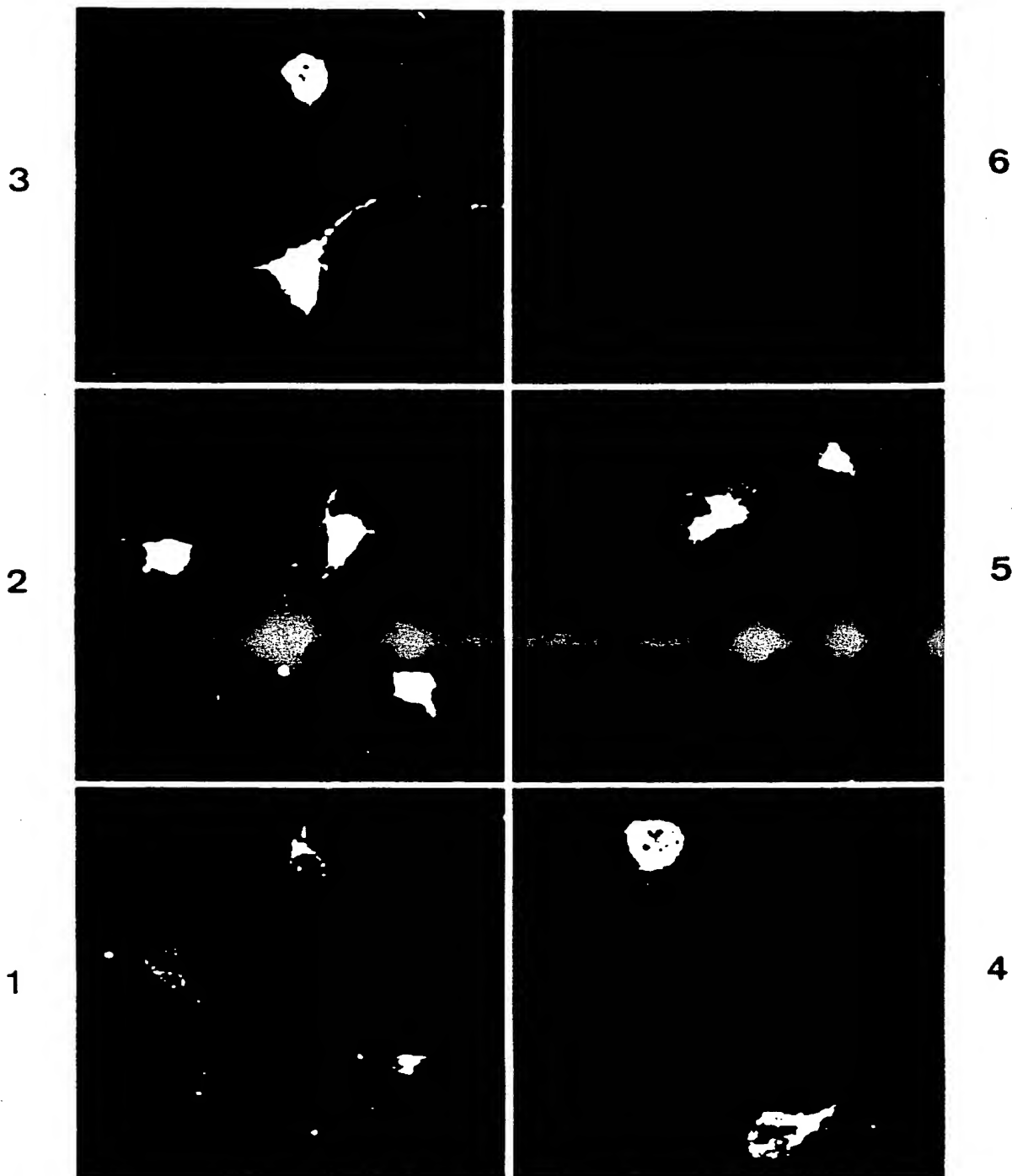
2/6

FIGURE 2



3/6

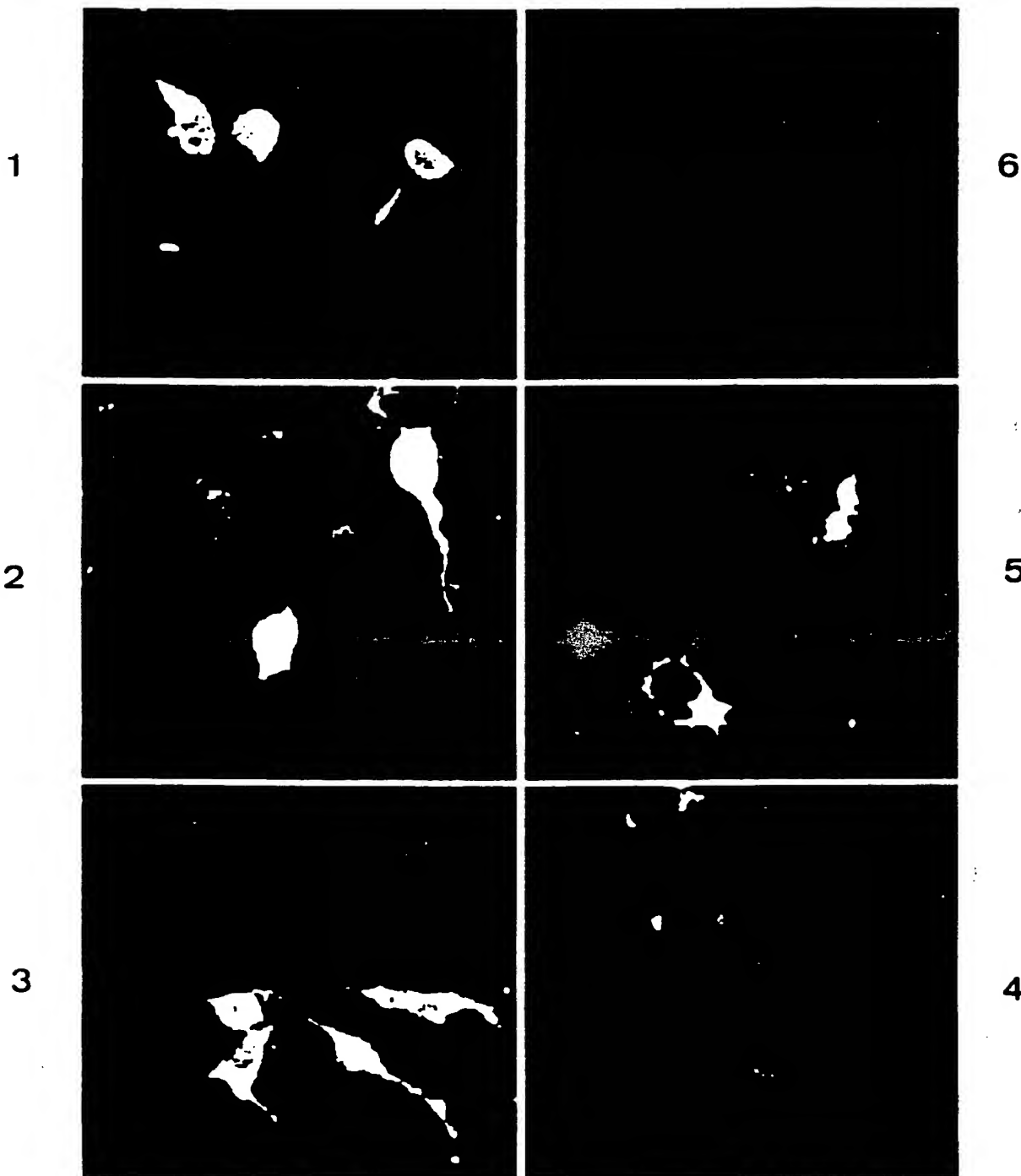
FIGURE 3





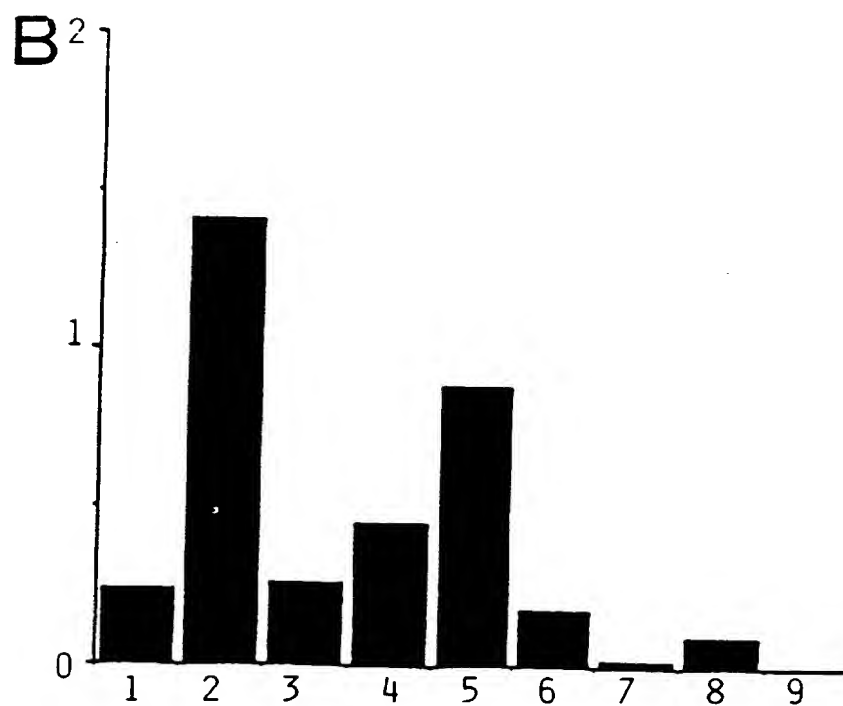
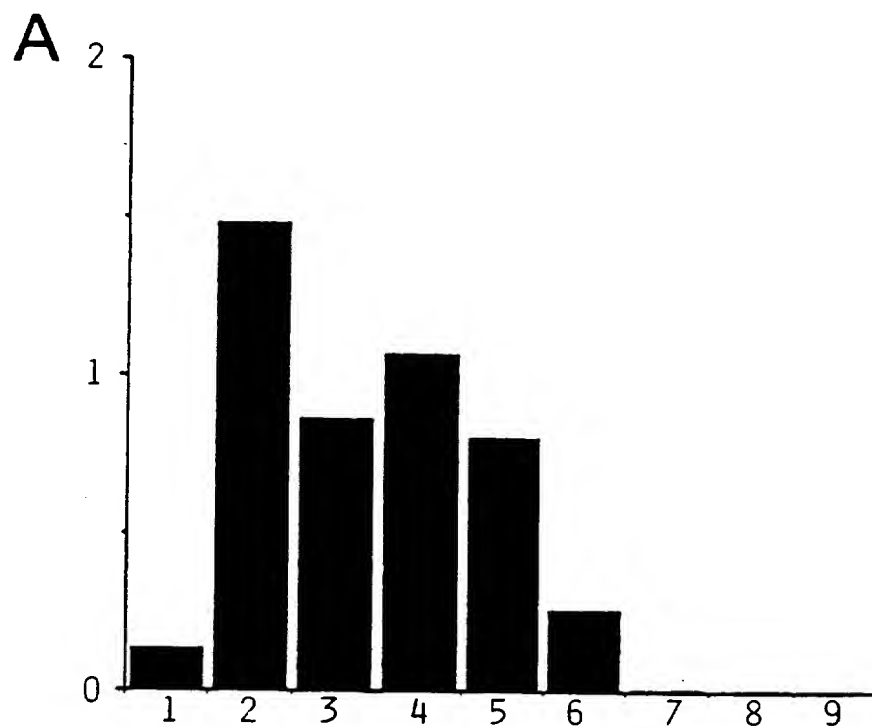
4/6

FIGURE 4



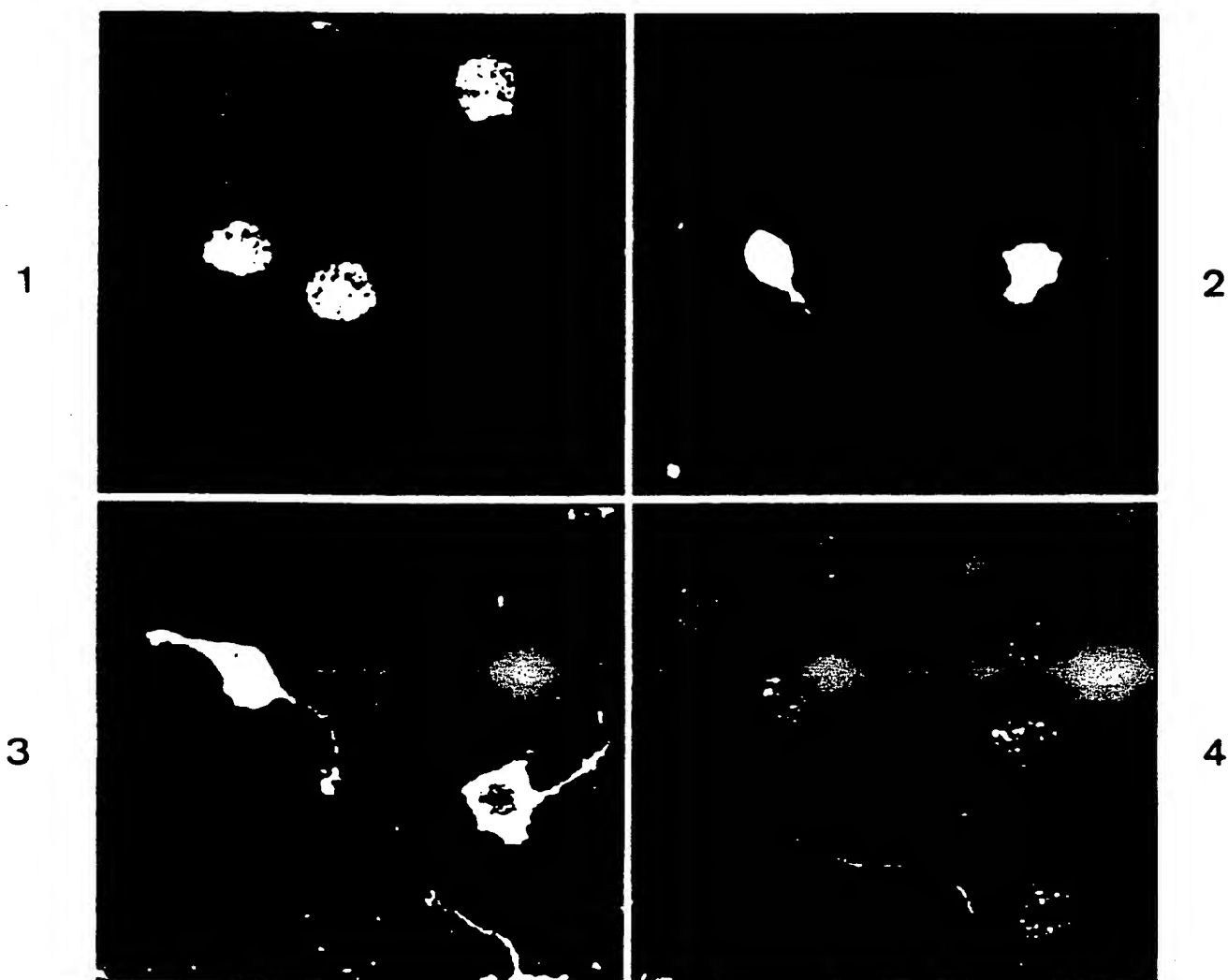
5/6

FIGURE 5



6/6

FIGURE 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/01553

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , vol. 269, no. 14, 8 April 1994, MD US, pages 10444-10450, XP002006023 D DEROSI ET AL.: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes" cited in the application see the whole document --- -/--	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 1997

Date of mailing of the international search report

26.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 96/01553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, no. 19, 1 October 1993, WASHINGTON US, pages 9120-9124, XP002006024 I LE ROUX ET AL.: "Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties" cited in the application see the whole document ---</p>	1-9
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 30, 26 July 1996, MD US, pages 18188-18193, XP002024485 D DEROSSE ET AL.: "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent" see the whole document -----</p>	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01553

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see annex
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Internationale No  
PCT/FR 96/01553

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, no. 19, 1 Octobre 1993, WASHINGTON US, pages 9120-9124, XP002006024 I LE ROUX ET AL.: "Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-9
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 30, 26 Juillet 1996, MD US, pages 18188-18193, XP002024485 D DEROSI ET AL.: "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent" voir le document en entier -----</p>	1-9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PC1/FR 96/01553

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07K14/47

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche.

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , vol. 269, no. 14, 8 Avril 1994, MD US, pages 10444-10450, XP002006023 D DEROSI ET AL.: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes" cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1-9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 Février 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26.02.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P



# **RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No. PCT/FR 96/ 01553

## **SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/210**

Remarque : La formule de la revendication 1 n'offre qu'un seul élément invariable. Ceci rend une recherche complète impossible pour des raisons d'économie. La recherche a été donc limitée aux composés des Tableaux 1 et 2.

Recherche incomplète

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 1-9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 96/01553

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
voir annex s.v.p.
2. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**